

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004 年 12 月 2 日 (02.12.2004)

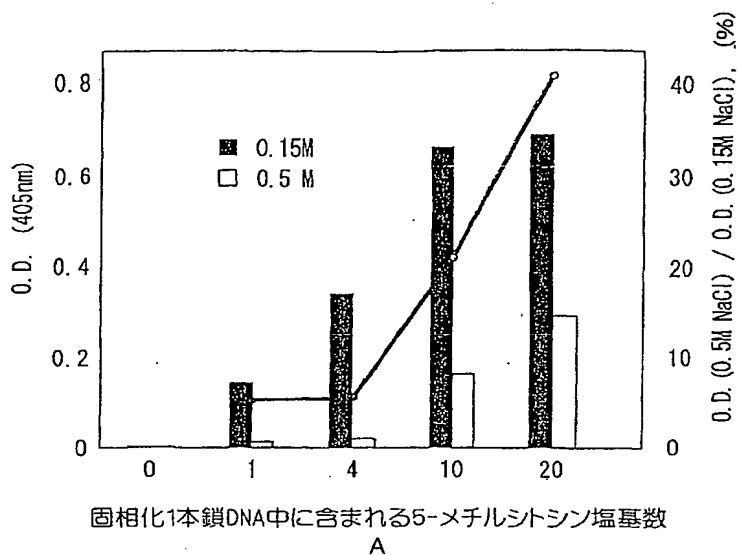
PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/104582 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/53, 33/50 (71) 出願人 および
(72) 発明者: 山川 直美 (YAMAKAWA, Naomi) [JP/JP]; 〒
350-0067 埼玉県 川越市 三光町38番1号 アクティ川越
3号棟203号 Saitama (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/014873
- (22) 国際出願日: 2003 年 11 月 21 日 (21.11.2003) (81) 指定国 (国内): CA, US.
- (25) 国際出願の言語: 日本語 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。
特願2003-146069 2003 年 5 月 23 日 (23.05.2003) JP

(54) Title: METHOD OF MEASURING DNA METHYLATION RATIO

(54) 発明の名称: DNAメチル化率の測定法



A...NUMBER OF 5-METHYLCYTOSINE BASES CONTAINED
IN SINGLE-STRAND DNA IN SOLID PHASE FORM

(57) Abstract: An immunochemical method of measuring 5-methylcytosine of DNA strand accurately through simple means. An antibody capable of specific binding with 5-methylcytosine is brought into contact with single-strand DNA, and while any antibody having undergone monovalent binding is separated from the DNA strand, the amount of antibody having undergone bivalent bonding is measured, thereby specifying close-packed region of 5-methylcytosine. Further, there is provided a method of measuring the density of 5-methylcytosine in DNA strand.

(57) 要約: 免疫化学的方法により、簡便かつ正確にDNA鎖の5-メチルシトシンを測定する方法を提供する。本発明では5-メチルシトシンと特異的に結合する抗体を1本

[続葉有]

WO 2004/104582 A1



鎖DNAと接触させ、1価結合した抗体をDNA鎖から分離し、2価結合した抗体量を測定することによって、5-メチルシトシンの密集領域を特定する。また、本発明の方法は、DNA鎖中の5-メチルシトシン密度を測定する方法も併せて提供する。

明 細 書

DNA メチル化率の測定法

技術分野

- 5 この出願の発明は、DNA メチル化率の測定方法に関するものである。さらに詳しくは、この出願の発明は、癌細胞の悪性度の評価や、あるいは *in vitro* 細胞の分化状態の評価等に有用な DNA メチル化の測定方法に関するものである。

背景技術

- 10 多細胞生物における細胞の分化や機能発現には、遺伝子情報が正しく発現されることが不可欠であるが、その発現制御には、転写調節因子のネットワークだけでなく、DNA のメチル化やクロマチン動態の変化といったエピジェネティック機構の関与が重要視されている。特に、ゲノム DNA 中のシトシンのメチル化は、遺伝子発現を負に制御していることが知られている。また、ゲノム上でのメチル化のパター
- 15 ンの差異が、ゲノムインプリンティングや X 染色体不活性化現象との関連を示すことや、さらには癌や ICF (immunodeficiency, centromeric instability and facial anomalies) 症候群、Rett 症候群、脆弱 X 症候群などの疾患にも関係することが報告されている (例えば非特許文献 1 参照)。

- DNA 鎖のメチルシトシンを測定する方法としては、メチル化感受性の制限酵素による切断片を比較する方法、bisulfite 法、methylation-specificPCR 法、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いる方法等が知られている(非特許文献 1 参照)。
- 20 また、特許文献 1 にはメチル化の対象となる CG 連続配列 (CpG アイランド) を含む DNA 鎖を特異的に PCR 増幅する方法が、特許文献 2 にはメチルシトシンを含む DNA 鎖に特異的にハイブリダイズする標識 DNA 断片を用いる方法が開示されてい
- 25 る。

【特許文献 1】

特表平 11-511776 号公報

【特許文献 2】

特表 2002-535998 号公報

【非特許文献 1】

5 波平昌一 他 実験医学 20(7):1-19-1024, 2002

発明の開示

前記のとおり、DNA 鎖のメチル化は、癌をはじめとする様々な疾患の重要な指標
10 であり、また遺伝子発現の制御に関係することから、例えば細胞の分化の程度を把握するための指標ともなり、これまでにその測定方法が様々な検討されている。

一方、例えば医療の現場において DNA メチル化を測定する場合には、迅速かつ
正確に判定結果が得られることが求められている。しかしながら、このような観点
からは従来の各方法は、必ずしも好ましい方法ではなかった。例えば、制限酵素を
15 用いる方法の場合にはサザンブロッティング等による断片の比較手続が必須であり、
bisulfite 法や特許文献 1 の方法では PCR 法とその産物の DNA 配列分析等の面倒な
作業を必要とする。特に、従来の方法では、被験サンプルとしての DNA 鎖に対し
て必要な処理を不可欠とするため、判定結果を得るまでに多大な時間と労力を要す
という問題点を有していた。

20 この出願の発明は以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、簡便かつ
正確に DNA メチル化の程度を測定する方法を提供することを課題としている。

この出願は、前記の課題を解決する発明として、5-メチルシトシンと特異的に結
合する抗体を 1 本鎖 DNA と接触させ、DNA 鎖に結合した抗体量を測定することを
25 特徴とする DNA メチル化率の測定方法を提供する。

またこの発明の方法においては、1 価結合した抗体を DNA 鎖から分離し、2 価

結合した抗体量を測定することによって、5-メチルシトシンの密集領域を特定することを好ましい態様の一つとしている。

さらにこの発明の方法においては、1本鎖 DNA の任意領域以外を2本鎖とし、1本鎖の領域について DNA メチル化率を測定することを別の好ましい態様として

5 いる。

なお、この発明において「DNA 鎖」とは、プリンまたはピリミジンが糖に β -N-グリコシド結合したヌクレオシドのリン酸エステル (dATP、dGTP、dCTP、dTTP) がホスホジエステル結合した分子を言い、特にゲノム DNA 鎖を意味する。また、この発明におけるその他の用語や概念は、発明の実施形態の説明や実施例において

10 詳しく規定する。またこの発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。例えば、遺伝子工学および分子生物学的技術は Sambrook and Maniatis, in Molecular Cloning-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989; Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in

15 Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y, 1995 等に記載されている。

以下、各発明について、実施形態を詳しく説明する。

この出願の発明は、前記のとおり、5-メチルシトシンと特異的に結合する抗体を1本鎖 DNA と接触させ、DNA 鎖に結合した抗体量を測定し、この抗体量によって

20 DNA メチル化率を決定することを特徴としている。

5-メチルシトシンと特異的に結合する抗体（以下、「抗 5-メチルシトシン抗体」と記載することがある）は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり、5-メチルシトシンに結合することができる全体分子、および Fab、F(ab')₂、Fv 断片等であるが、特に、モノクローナル抗体の全体分子であることが好ましい。モノク

25 ローナル抗 5-メチルシトシン抗体は、5-メチルシトシンを免疫原として、公知のモノクローナル抗体作製法（例えば、「単クローン抗体」、長宗香明、寺田弘共著、廣

川書店、1990 年； "Monoclonal Antibody" James W. Goding, third edition, Academic Press, 1996) に従い作製することができる。また、5-メチルシトシンを特異的に認識するモノクローナル抗体は、文献（例えば、Reynaud C. et al., Cancer Lett, 1992 Jan 31;61(3):255-62; Mizugaki M. et al., Biol Pharm Bull. 1996 Dec;19(12):1537-40; Podesta A. et al., Int J Biochem, 1993 Jun;25(6):929-33) 等
5 が知られており、これらを使用することもできる。

DNA 鎖に結合した（すなわち、DNA 鎖中の 5-メチルシトシンに結合した）抗体量の測定は、例えば、抗 5-メチルシトシン抗体を標識化し、この標識シグナル量を測定することによって行うことができる。また、抗体に結合する 2 次抗体（例えば
10 抗 IgG 抗体）を標識化し、DNA 鎖に結合した抗 5-メチルシトシン抗体（1 次抗体）に 2 次抗体を結合させ、その標識シグナルを測定する方法（いわゆる「サンドイッチ法」）によって行うこともできる。標識は、酵素、放射性同位体または蛍光色素を使用することができる。酵素は、turnover number が大であること、抗体と結合させても安定であること、基質を特異的に着色させる等の条件を満たすものであれば
15 特段の制限はなく、通常の EIA に用いられる酵素、例えば、ペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、グルコース-6-リン酸化脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素等を用いることもできる。また、酵素阻害物質や補酵素等を用いることもできる。これら酵素と抗体との結合は、マレイミド化合物等の架橋剤を用いる公知の方法
20 によって行うことができる。基質としては、使用する酵素の種類に応じて公知の物質を使用することができる。例えば酵素としてペルオキシダーゼを使用する場合には、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）を、また酵素としてアルカリフォスファターゼを用いる場合には、パラニトロフェノール等を用いることができる。放射性同位体としては、 ^{125}I や ^3H 等の通常の RIA で用いられているものを使用することが
25 できる。蛍光色素としては、フルオレッセンスイソチオシアネート（FITC）やテトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）等の通常の蛍光抗体法に用いら

れるものを使用することができる。また、このような標識シグナルの測定は、標識として酵素を用いる場合には、酵素作用によって分解して発色する基質を加え、基質の分解量を光学的に測定することによって酵素活性を求め、これを結合抗体量に換算し、標準値との比較から抗体量が算出される。放射生同位体を用いる場合には、
5 放射性同位体の発する放射線量をシンチレーションカウンタ等により測定する。
また、蛍光色素を用いる場合には、蛍光顕微鏡を組み合わせた測定装置によって蛍光量を測定すればよい。

この発明の方法は、液相系で行うこともでき、固相系で行うこともできるが、安定した測定値を得るためには、固相系で行うことが好ましい。すなわち、被験試料
10 である DNA 鎖を固相に固定化し、この固定化 DNA 鎖に抗 5-メチルシトシン抗体を反応させる。DNA 鎖（特にゲノム DNA）を固相に固定化するには、例えば、固相に 2 本鎖リンカー DNA を固定化し、このリンカーの端部と一致させて制限酵素切断した 2 本鎖ゲノム DNA をリガーゼを用いて連結させる方法等を採用することができる。リンカー DNA を固相に固定化するには、リンカー DNA の一端を公知の
15 方法によりビオチン化し、これをアビジンコートした固相に固定化することによって行うことができる。あるいは、官能基を導入したリンカー DNA を合成し、表面処理した固相担体表面にリンカー DNA を点着し、共有結合させる方法（例えば、Lamture, J.B. et al. Nucl. Acids Res. 22:2121-2125, 1994; Guo, Z. et al. Nucl. Acids Res. 22:5456-5465, 1994）を採用することもできる。さらに、以上の方法により固定化した 2 本鎖 DNA は、例えば塩酸溶液等によって変性処理することによって 1 本鎖 DNA とすることができる。

この発明の方法は、また、1 価結合した抗 5-メチルシトシン抗体を DNA 鎖から分離し、2 価結合した抗体量を測定することによって、5-メチルシトシンの密集領域を特定することを好ましい態様の一つとしている。すなわち、抗体（IgG）分子
25 は、1 本の Fc 部分と 2 本の Fab 部分とからなっており、対象のエピトープに対して Fab 部分の先端が結合する。従って、図 1 に示したように、DNA 鎖の 5-メチル

シトシンが1個の場合には、抗5-メチルシトシン抗体の1本のFab部分が結合し(1価結合:図1B)、一方、適当な距離に2個の5-メチルシトシンが存在する場合には、2本のFabがそれぞれの5-メチルシトシンに結合する(2価結合:図1A)。抗体の2価結合は、1価結合に比べて約 10^3 (M^{-1}) 倍も強い親和性を持つことが知られているため、1価結合した抗体を除去し、2価結合した抗体を測定することによって、5-メチルシトシンが密集する領域を高精度で検出することができる。

ここで抗体分子とDNA分子の分子サイズについて論ずる。IgG分子構造はおおよそアルファベットのTに似た構造を呈しており、2つのFabの両端間、すなわち2つの抗原結合部位の距離はおおよそ14.2nmであることが明らかとなっている(Sarma V.R. et al., J.Bio.Chem., vol.246, pp3753-3759, 1971)。また、WatsonとCrickが提唱したDNAの2重らせん構造のB型DNAでは、1塩基対ごとに0.34nmの間隔で並び、DNAのらせんが1回転する間隔であるピッチは3.4nmである。これから換算すると、IgG分子に存在する2カ所の抗原結合部位の約14nmは、塩基数に換算すると約42塩基の距離に相当する。従って、抗5-メチルシトシン抗体は、同一DNA上に存在する異なる2つの5-メチルシトシン間の距離がおおよそ40塩基以内に存在すれば、DNAに対して2価結合することができる。

後記実施例4、5に示したように、1本鎖DNA中の5-メチルシトシン含有率が例えばおおよそ4.4%に上った場合には、抗5-メチルシトシン抗体は複数個の5-メチルシトシンを含む1本鎖DNAに2価結合できるようになり、それは、同一1本鎖DNA上の異なる2つの5-メチルシトシン分子間の平均距離が約14nm以下になると推察される。

この原理を利用して、抗5-メチルシトシン抗体をnano-scale-rod、すなわちおおよそ14nmを測定する「ナノものさし」として利用することができる。具体的には、同一1本鎖DNA分子上の異なる2つの5-メチルシトシン分子間の距離を測る場合、抗体(IgG)が1価結合しかできない場合には5-メチルシトシン分子間の距離はおおよそ14nm以上で、2価結合できる場合には14nm以内の距離にあると言える。こ

れを利用して、DNA 中の 5-メチルシトシン含有率を求めることが可能である。

なお、1価結合抗体を除去するには、例えば、アルカリ性または酸性の緩衝液、高塩濃度の緩衝液を作用させる方法、抗原（5-メチルシトシン）の過剰量を共存させて拮抗させる方法、あるいは溶液温度を上昇させる方法等を採用することができる。またこの発明の方法においては、抗 5-メチルシトシン抗体を反応させ、1価結合および2価結合のそれぞれの抗体を DNA 鎖に結合させた後、上記の方法によって1価結合抗体を除去（解離）させてもよく、あるいは、上記の緩衝液等を用いて、2価結合の抗体だけを DNA 鎖に結合させるようにしてもよい。

さらにこの発明の方法においては、1本鎖 DNA の任意領域以外を2本鎖とし、1本鎖の領域について DNA メチル化率を測定することを別の好ましい態様としている（図3参照）。この方法は、特に DNA のメチル化が重要な意味をもつ領域（例えば遺伝子の発現制御領域等）のみを対象として5-メチルシトシンの存在量やその密度を測定する場合に特に好ましい。測定対象領域以外を2本鎖とするには、2本鎖とする領域の DNA 配列に対して相補的な1本鎖オリゴヌクレオチド断片をアニールさせる方法等を採用することができる。

以下、実施例を示してこの出願の発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例によって限定されるものではない。

実施例1：抗体の作成

5-methylcytidine-KLH（KLH＝キーホールリンペットヘモシアニン）コンジュゲート（100 μ g）を FCA（フロイント・コンプリート・アジュバント）と共にマウス足掌に投与し、9日目にリンパ節を取り、マウスミエローマ細胞（SP2/0）と融合させた。得られた融合細胞を96穴培養プレート3枚に撒き、常法に従って HAT 培地を用いたハイブリドーマの選択的育成を行った。培養開始から約10日から2週間後に、育成してきたハイブリドーマの培養上清について抗体活性をスクリーニングした。具体的には、抗原 [5-methylcytidine を BSA（牛血清アルブミン）に結合

させた 5-methylcytidine-BSA コンジュゲート]を 10 μ g/ml の濃度で PBS に溶解し、これを 96 穴 ELISA 用プレートにコーティングし、その後、BSA で常法に従ってブロッキングした後、これに前記ハイブリドーマの培養上清を反応させ、抗体反応陽性を呈したハイブリドーマを取得した。さらに、cytidine を BSA に結合させた
5 cytidine-BSA コンジュゲートに対する抗体反応性も同様に測定し、cytidine-BSA に対して交差性が見られない、あるいは低い抗体を産生するハイブリドーマを選択し、最終的にこのハイブリドーマから常法に従い、抗 5-メチルシトシン抗体を得た。

実施例 2 : 抗体の特異性の検討(1)

実施例 1 で作製した抗 5-メチルシトシン抗体の反応特異性を調べるため、以下の
10 実験を行った。

マウス focal adhesion kinase (GenBank/M95408) の cDNA 塩基配列のうち、1966 番目から 2190 番目の塩基にあたる 225 塩基の DNA 断片 (図 3、配列番号 1) を PCR 法により増幅した。この時、PCR 用センス鎖プライマーは、5' 位をビオチン化したオリゴ DNA を使用した。鋳型 DNA にはマウス脳 cDNA を用い、以下の
15 条件で PCR を行った。

なお、PCR 産物である 2 本鎖 DNA のセンス鎖には 50 塩基のシトシン塩基が存在するが、PCR プライマー部分を除く 46 塩基のうちの 20 塩基のシトシンがランダムに 5-メチルシトシンに置換されるように (図 3 参照)、PCR 反応溶液中に 5-methyl-2' -deoxycytidine-5' -triphosphate (5m-dCTP) を混入させた。具体的には、下記のデオキシヌクレオチド・ストック A 液とストック B 液を 26 対 20 の比率で混合した溶液を用いて PCR 反応を行った。

PCR 用プライマー :

センスプライマー : 5' -Biotin-CGTGAAGCCTTTTCAAGGAG-3' (配列番号 2)

アンチセンスプライマー : 5' -TCCATCCTCATCCGTTCTTC-3' (配列番号 3)

25 使用酵素 :

Expand High-Fidelity PCR System (ロッシュ・ダイアグノスティクス社製)

デオキシヌクレオチド：

ストック A 液 (0.5mM dATP, 0.5mM dTTP, 0.5mM dGTP, 0.5mM dCTP)

ストック B 液 (0.5mM dATP, 0.5mM dTTP, 0.5mM dGTP, 0.5mM 5m-dCTP)

上記デオキシヌクレオチド・ストック溶液は、PCR 反応液 50 μ l 中に、A 液と B
5 液の合計が 5 μ l になるように添加した。それぞれの割合は作製する PCR 産物にど
れだけの割合で 5-メチルシトシンを取り込ませるかによって任意に設定できる。

反応条件：

(1)94.5, 2min x 1 サイクル

(2)[94.5, 30sec/58°C, 30sec/72°C, 40sec] x 28 サイクル

10 (3)72°C, 8min x 1 サイクル

PCR 反応はサーマルサイクラーMP (宝酒造社) を用いて行った。

PCR 反応後、PCR 産物から常法に従って DNA を精製し、アビジンコートした
96 穴マイクロタイタープレートに固定化した。次いで、この 2 本鎖 DNA を、50mM
塩酸で 2 分間処理して 1 本鎖化した。この処理後にウェルを PBS/1mM EDTA で数
15 回洗浄して、アビジンに捕獲された 1 本鎖 DNA のみをウェルに固定化した。

この固定化した 1 本鎖 DNA に対して、実施例 1 で作製した抗 5-メチルシトシン
抗体 (1 次抗体) と、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体
(2 次抗体) を用いて、常法に従い ELISA を行った。ただし、マイクロタイター
プレートの通常の洗浄は、10mM Tris-HCl (pH7.6) /0.15M NaCl/0.05% Tween20
20 を含む緩衝液で行い、基質にはパラニトロフェニルリン酸(シグマ社, N-1891)を用
い、基質と反応させてから一定時間後に 405nm の吸光度を測定した。

ウェル上に固定化した 1 本鎖 DNA 中に含まれる 5-メチルシトシン含量を任意に
変え、その時の抗 5-メチルシトシン抗体の反応性を検討した。その ELISA 測定結
果を図 4 に示す。

25 図 4 に示したとおり、抗 5-メチルシトシン抗体はウェル上に固定化した DNA 中
の 5-メチルシトシン含量が増加するに従い、抗体結合性が増加した。塩酸処理によ

り 1 本鎖化せずに 2 本鎖のままウェル上に固定化した場合、その 2 本鎖 DNA は合計で約 43 個の 5-メチルシトシンを含む 2 本鎖 DNA となるが、この 2 本鎖 DNA に抗 5-メチルシトシン抗体は結合しなかった。すなわち、抗 5-メチルシトシン抗体は、5-メチルシトシンを含む 2 本鎖 DNA には結合せず、5-メチルシトシンを含む 1 本鎖 DNA にのみ特異的に結合することが確認された。

実施例 3：抗体の特異性の検討(2)

20 個の 5-メチルシトシンをランダムに有する DNA 鎖を対象とし、抗 5-メチルシトシン抗体（1 次抗体）の反応後、異なる濃度の NaCl を含むウェル洗浄緩衝液で 10 分間処理することを除き、実施例 2 と同様の方法により ELISA を実施した。また、1 次抗体反応後に 0.15M NaCl を含む通常のウェル洗浄に使用する緩衝液 [10mM Tris-HCl (pH7.6) /0.15M NaCl/0.05% Tween20] で 10 分間処理したものを比較対照（100%）とした。

結果は図 5 に示したとおりである。NaCl の濃度に依存して、抗 5-メチルシトシン抗体のメチルシトシンへの結合が阻害されるが、0.5 から 1M の NaCl 処理（10 分）でも抗原抗体結合がある程度保持される事が確認された。

実施例 4：抗体の特異性の検討(3)

96 穴マイクロタイタープレートに固定化する 1 本鎖 DNA あたりに含まれる 5-メチルシトシン含量を変化させた場合の、NaCl 処理に対する感受性を測定した。すなわち、1 次抗体結合後、0.5N NaCl を含むウェル洗浄緩衝液（10mM Tris-HCl (pH7.6) /0.5M NaCl/0.05% Tween20）でウェルを 10 分間処理することを除き、実施例 3 と同様に実施した。

結果は図 6 に示したとおりである。なお、10mM Tris-HCl (pH7.6) /0.5M NaCl/0.05% Tween20 を用いた処理の代わりに、通常のウェル洗浄緩衝液（10mM Tris-HCl (pH7.6) /0.15M NaCl/0.05% Tween20）で同様に 10 分間処理したものを比較対照とした。

図 6 にも示したとおり、抗 5-メチルシトシン抗体は、96 穴マイクロタイタープレ

ートのウェルに固定化してある 1 本鎖 DNA(225 塩基)中に平均 4 個の 5-メチルシトシンが含まれる場合には、0.5M NaCl 処理で抗原抗体反応は解離しやすいが、ウェル上に固定化された 1 本鎖 DNA(225 塩基)中に平均 10 個の 5-メチルシトシンが存在すると、抗原に対する抗体の結合性は安定化し、0.5M NaCl 洗浄に対する抵抗性が急に増加することが確認された。

実施例 5 : 抗体の特異性の検討(4)

実施例 1 で作成した抗 5-メチルシトシン抗体はマウス IgG2a、 κ 鎖の抗体であるが、この抗体の Fab フラグメントを作製し、Fab フラグメントと IgG 全体分子の NaCl 処理に対する結合抵抗性を比較検討した。ELISA プロトコールは実施例 4 に従った。

結果は図 7 に示したとおりである。一般的に、抗原との結合部位を 2 カ所持つ IgG 分子と、結合部位が 1 カ所の Fab フラグメントとでは、抗原と抗体のアフィニティ（平衡定数： M^{-1} ）はおよそ 1000 倍の開きがあり、抗原と 2 価結合できる IgG 分子の方がより強い親和性を持つ。図 7 から明らかなように、抗 5-メチルシトシン抗体の IgG 分子は、この IgG から派生した Fab 分子より高塩濃度（NaCl）処理に対する抵抗性が強い。すなわち、同じ NaCl 濃度で比較すると、Fab フラグメントは IgG 分子より抗原から早く解離することが確認された。

以上の結果は、実施例 4 の結果と併せて、以下のとおり考察される。実施例 4 では、1 本鎖 DNA 中の 5-メチルシトシン含有率がおよそ 1.8% の場合には高濃度の NaCl（ここでは 0.5M の NaCl）による処理で、抗原抗体反応の大部分が解離するが、1 本鎖 DNA 中の 5-メチルシトシン含有率がおよそ 4.4% に上った場合には高濃度の NaCl 処理によっても、抗原抗体結合を維持する IgG 分子の割合が急に増加した。

これはすなわち、実施例 5 の Fab フラグメントを用いた試験結果からも明らかなように、1 本鎖 DNA 中の 5-メチルシトシン含有率が DNA 分子の特定領域内に置いて約 1.8% から約 4.4% に移行することによって、抗 5-メチルシトシン抗体（IgG

分子) が 1 価結合から 2 価結合に移行することを意味している。言い換えれば、抗原 (5-メチルシトシン) が一定密度以上存在することによって、抗 5-メチルシトシン抗体 1 分子 (IgG) が同一 DNA 分子上に存在する複数個の 5-メチルシトシン塩基に 2 価結合できるようになることを意味している。

5 実施例 6 : 特定領域の 5-メチルシトシン含量の測定例

抗 5-メチルシトシン抗体は 2 本鎖 DNA と反応しないことを利用し、2 本鎖 DNA 中の特定の領域を限定的に 1 本鎖化し、この 1 本鎖を測定対象領域として 5-メチルシトシン含量を測定した。

実施例 2 の方法に従い、図 3 (配列番号 1) に塩基配列を示した 2 本鎖 DNA の
10 センス鎖 DNA 中に 20 塩基の 5-メチルシトシンを含むように PCR 法で 2 本鎖 DNA を合成した。なお、PCR プライマーは、実施例 2 と同一とした。

次に、変性用緩衝液[10mM Tris-HCl(pH 8.1)/50mM KCl/1.5mM MgCl₂]に 2 本鎖 DNA 約 500ng と、50pmole の合成オリゴ DNA (図 8 の 3 種類 : それぞれ配列番号 4、5、6) を加えて全量 50 μ l とし、これを PCR 用チューブ (200 μ l 容量)
15 に入れ、PCR 用サーマルサイクラーにセットした。この反応液を 98°C、2 分間の変性処理後、直ちに 65°C、30 分の処理を行い、DNA の再会合を誘導した。これにより、2 本鎖 DNA の一部の領域が、加えた合成オリゴ DNA インサートの妨害より、限定した領域において 1 本鎖化した状態で安定する。すなわち合成オリゴ DNA インサートが 2 本鎖 DNA にサンドイッチされた状態で安定化する。得られた PCR 産物
20 物を、アビジンコートした 96 穴マイクロタイタープレートの基質上に、オリゴインサートがサンドイッチされた状態のまま固定化した。ここでは前記の PCR チューブ内の全反応溶液 50 μ l のうち、5 μ l を 96 穴マイクロタイタープレートの 1 ウェルに加えて固定化した。これより以降の操作は、前記の実施例 4 と同様の ELISA プロトコールに従って行った。ただし、2 次抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体
25 を用い、基質としてはテトラメチルベンチジン (SIGMA 社 cat# T-0440) を用い、室温において 30 分間の発色反応後、基質 100 μ l に対して 0.3M 硫酸を 20 μ l 加え

て反応を停止し、450nm における吸光度を測定した。

結果は図 9 に示したとおりである。被験対象である 2 本鎖 DNA (225bp) にはセンス鎖あたり約 20 塩基の 5-メチルシトシンを含有している。2 本鎖 DNA の端部に近い領域にハイブリダイズするオリゴインサート # 1 を使用した場合に最も吸光度
5 が高く、オリゴインサートのハイブリダイズする領域が 2 本鎖 DNA の中央領域に入るにつれて吸光度が低くなっていく。使用したオリゴインサートは全て 30mer である。従ってこのとき、オリゴインサート # 1、# 2 および # 3 が 2 本鎖 DNA に結合した場合には、それぞれ 3 塩基、6 塩基および 11 塩基のシトシンが 1 本鎖として露出することになり、このうちのおよそ 50% の割合のシトシンが 5-メチルシ
10 シンに置き換わっている。2 本鎖 DNA から露出するシトシン数が少ないオリゴインサート # 1 の吸光度の方が高く、露出するシトシン数がより多いオリゴインサート # 2、# 3 では吸光度が低くなっている。すなわちこれは、2 本鎖 DNA 上のオリゴインサートがハイブリダイズする位置は 2 本鎖 DNA の末端部分の方が安定し、中央部分に行くに従って 2 本鎖 DNA から排除され易いことを意味している。これ
15 を解消する方法としては、DNA 同士の結合より強固に結合する 1 本鎖 RNA か、あるいは同じく DNA 同士の結合より強固に結合するペプチド核酸 (DNA や RNA とは異なりリン酸結合ではなくペプチド結合で骨格を形成しているオリゴ DNA。PNA と略す。) を用いることにより、標的 2 本鎖の中央部分であっても効率よく、かつ限局的に 1 本鎖化を行うことができる。これらに限らず、DNA 同士の結合より
20 強く、なおかつ DNA とハイブリダイズする物質であれば、前記のオリゴインサートの場合と同様の結果が得られる。

図面の簡単な説明

【図 1】

25 (A)は、5-メチルシトシンを含む 1 本鎖 DNA に対する抗 5-メチルシトシン抗体の 2 価結合を示し、(B)は 1 価結合を示す。

【図 2】

部分的に 1 本鎖とした DNA 鎖の 5-メチルシトシンに対する抗 5-メチルシトシン抗体の結合状態を示す。

【図 3】

- 5 実施例で使用した DNA 鎖の塩基配列である。四角で囲ったシトシンが任意の割合でランダムに 5-メチルシトシンに置換する。

【図 4】

DNA 鎖に含まれる 5-メチルシトシンの個数と、抗 5-メチルシトシン抗体の結合の程度を示したグラフである。

10 【図 5】

1 次抗体 (5-メチルシトシン抗体) 反応後に NaCl 処理した場合の、NaCl 濃度と抗 5-メチルシトシン抗体の結合の程度を示したグラフである。

【図 6】

- 15 1 次抗体 (5-メチルシトシン抗体) 反応後に 0.15M または 0.5M の NaCl で処理した場合の、DNA 鎖に含まれる 5-メチルシトシンの個数と、抗 5-メチルシトシン抗体の結合の程度を示したグラフである。

【図 7】

各濃度の NaCl で処理した場合の、5-メチルシトシン抗体 (IgG 分子) とその Fab 分子の 5-メチルシトシン結合状態を示したグラフである。

20 【図 8】

実施例で 1 本鎖 DNA 領域を形成するために使用した合成オリゴ DNA インサート #1~3 の塩基配列と、これらのインサートがハイブリダイズする DNA 鎖の塩基配列である。インサートのハイブリダイズ領域を枠で示した。

【図 9】

- 25 合成オリゴ DNA インサート #1~3 をハイブリダイズした 2 本鎖 DNA に対する抗 5-メチルシトシン抗体の結合の程度を示したグラフである。

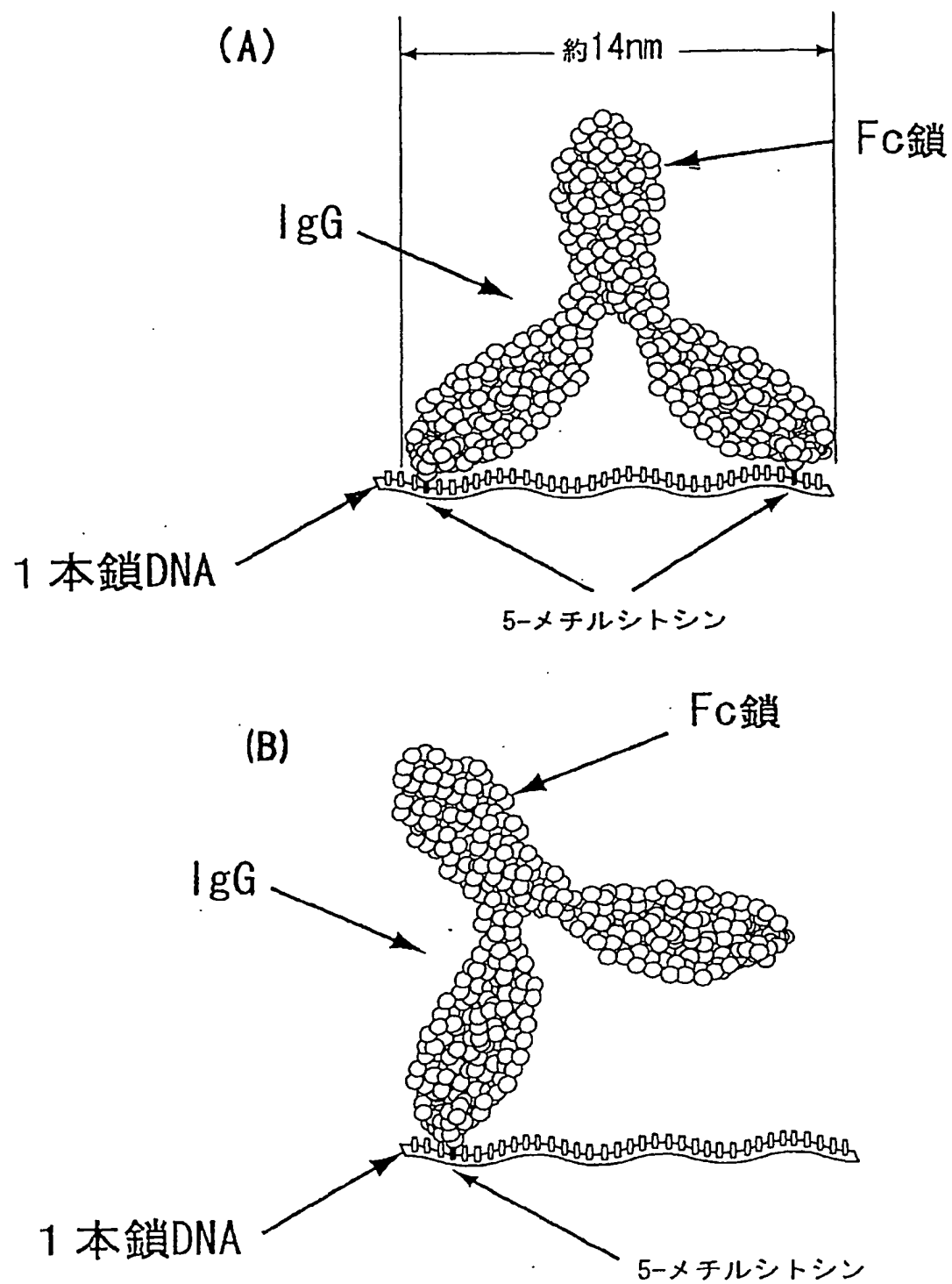
産業上の利用可能性

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、DNA 鎖の 5-メチルシトシンを簡便かつ正確に測定することが可能となり、例えば癌の悪性度の診断等に新たな手段が提供される。

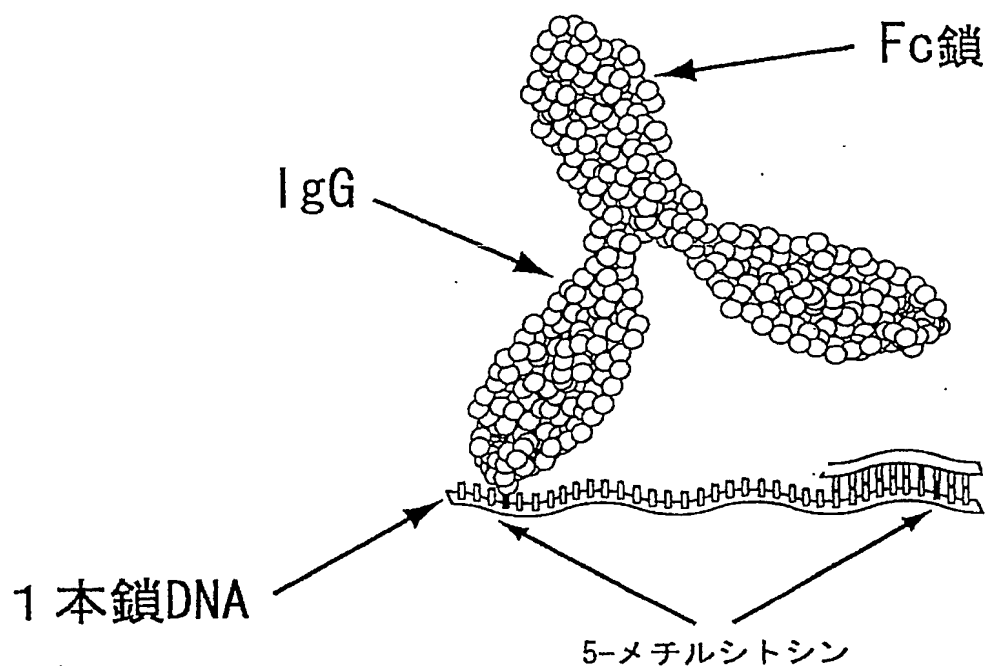
請 求 の 範 囲

1. 5-メチルシトシンと特異的に結合する抗体を1本鎖DNAと接触させ、DNA鎖に結合した抗体量を測定することを特徴とするDNAメチル化率の測定方法。
- 5 2. 1価結合した抗体をDNA鎖から分離し、2価結合した抗体量を測定することによって、5-メチルシトシンの密集領域を特定する請求項1の方法。
3. 1本鎖DNAの任意領域以外を2本鎖とし、1本鎖の領域についてDNAメチル化率を測定する請求項1または2の方法。

〔図1〕



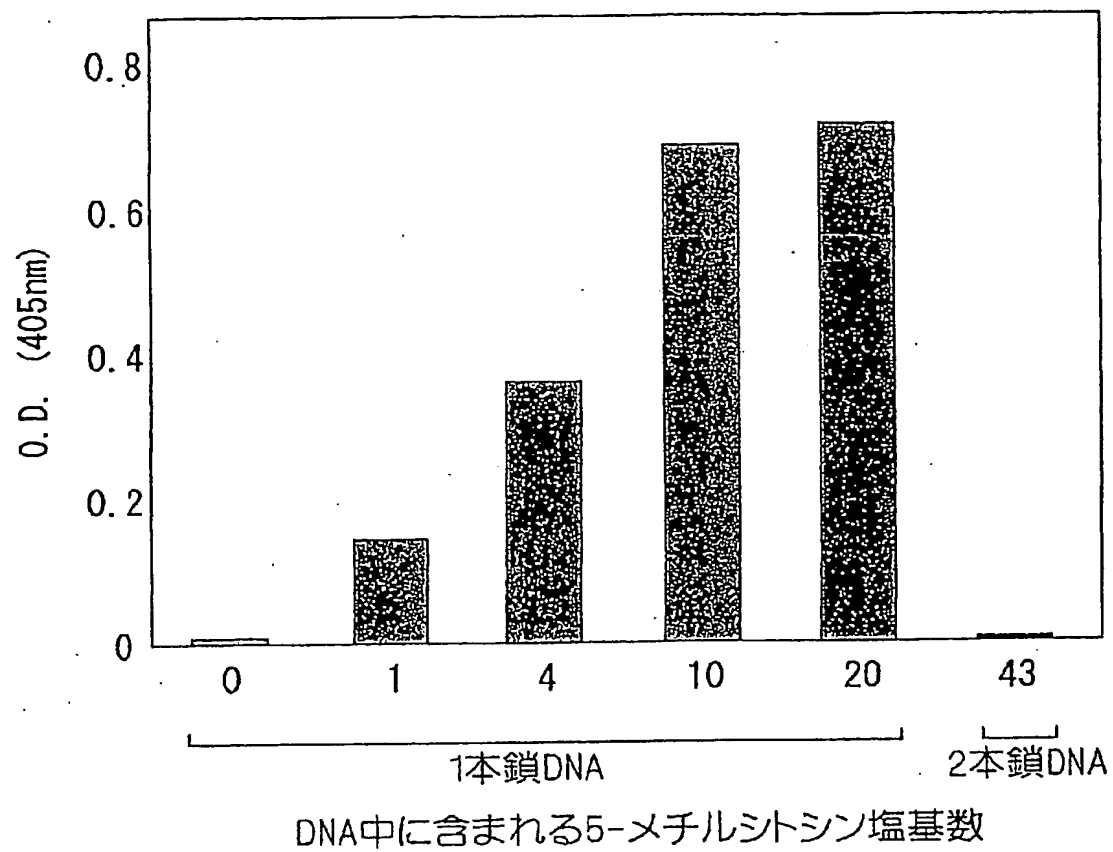
【図 2】



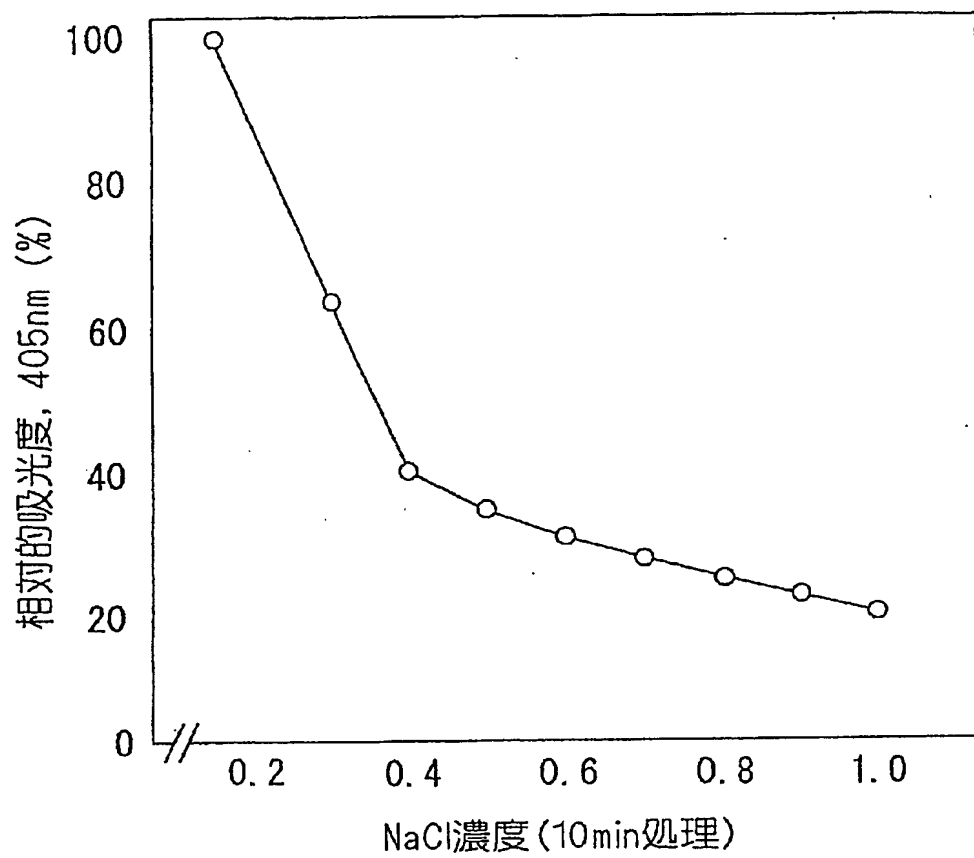
【図 3】

ビオチン化センスプライマー
 5'-Biotin-CGTGAAGCCTTTTCAAGGAG-TGAAGAA[CAATGATGTGATCGGT]GAATT
 GAAAATGGGGAAAGATTACCAATG[CCTCCAAATTGT[CCTCCCA[CCCTCTA]CAGCC
 TTATGA[GAAATGTTGGG[CCTATGACCCCAGCAGG]GG[CCAGGTTTA]TGAACT
 AAAAGCTCAGCTCAGCA[CAATCCTGGAGGAGGAGAAGGTG]CAGCAAGAAGAAC
 GGATGAGGATGGA-3'

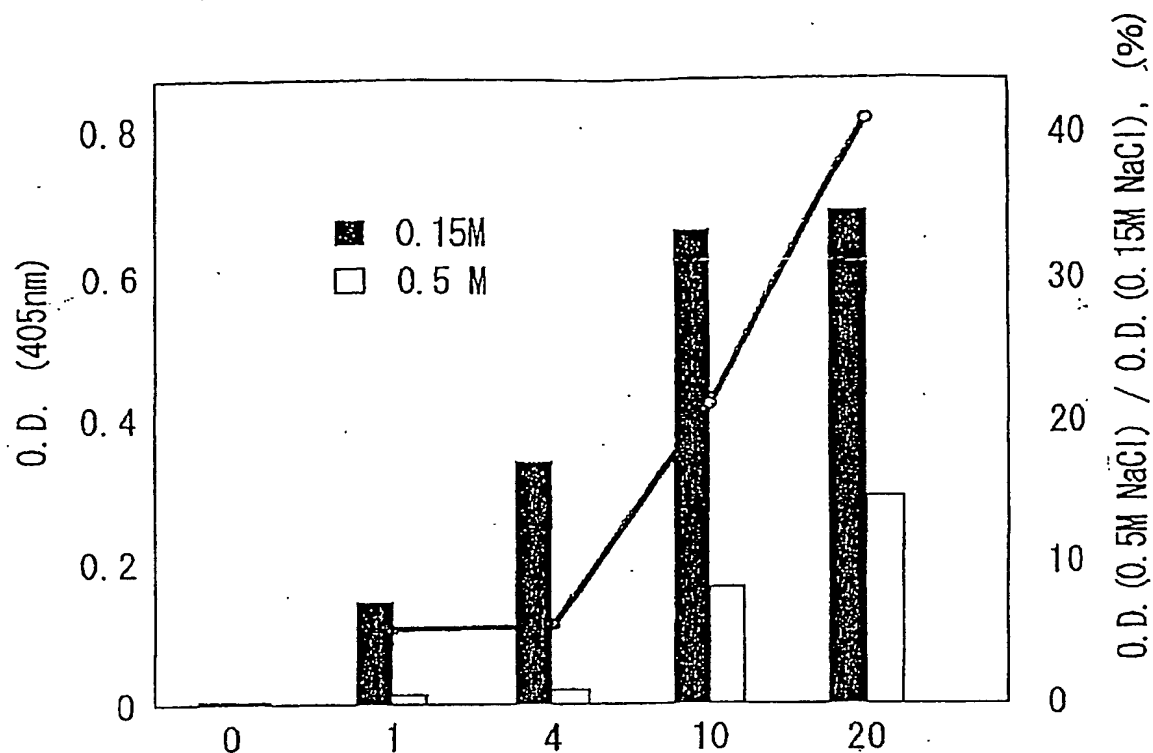
【図 4】



【図 5】

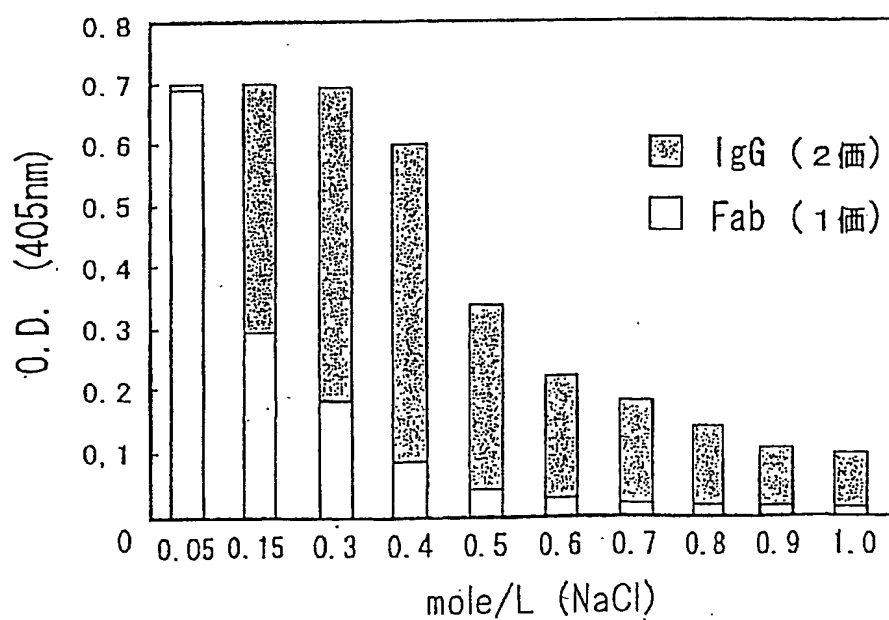


【図 6】



固相化1本鎖DNA中に含まれる5-メチルシトシン塩基数

【図 7】



【図 8】

使用する合成オリゴ DNA インサート

合成オリゴ DNA インサート # 1 (30mer)
5' -CACATCATTGTTCTTCACTCCTGAAAAGG-3'

合成オリゴ DNA インサート # 2 (30mer)
5' -CAATTTGGAGGCATTGGTAATCTTCCCA-3'

合成オリゴ DNA インサート # 3 (30mer)
5' -TTCGTCATAAGGCTGTAGAGGGTGGGAGGA-3'

合成オリゴ DNA インサートが結合する部位

合成オリゴ DNA インサート # 1

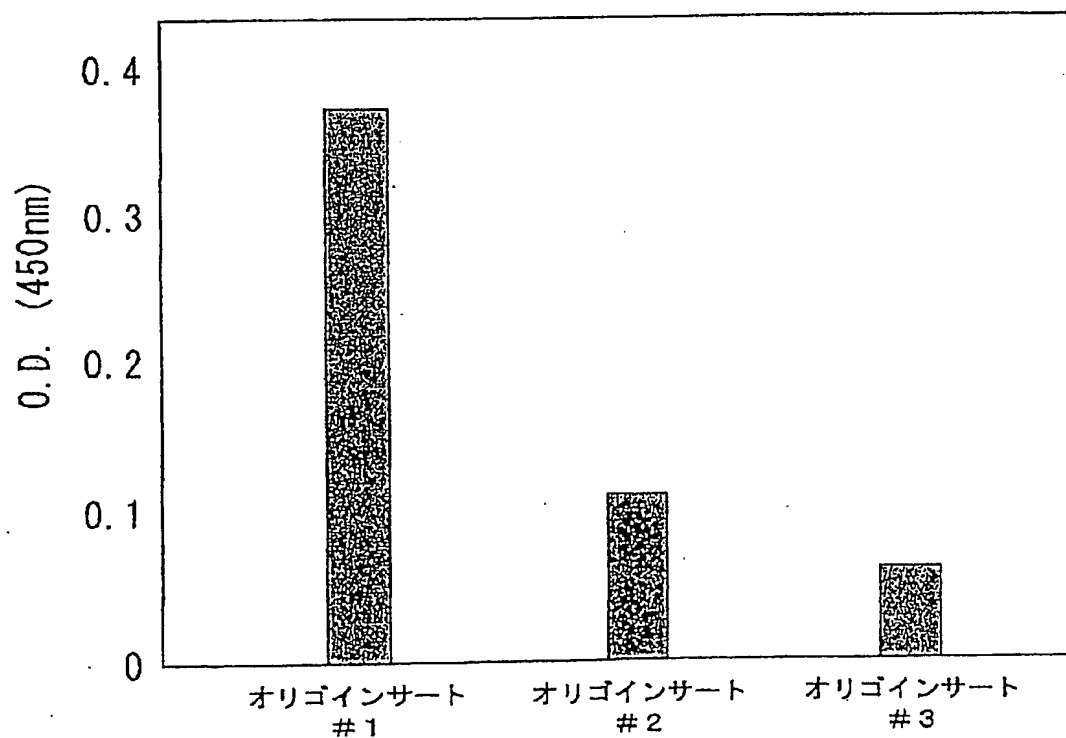
5'-Biotin-CGTGAAG CCTTTTCAAGGAGTGAAGAACAATGATGTG ATCGGTCGAATTGAAAA

合成オリゴ DNA インサート # 2

合成オリゴ DNA インサート # 3

TGGGGAAAGATTACCAATGCCTCCAAATTG TCCTCCACCCCTCTACAGCCTTATGACGAA ATGTT
GGGCCTATGACCCAGCAGGCGGCCAGGTTTACTGAACTAAAAGCTCAGCTCAGCACAATCCTG
GAGGAGGAGAAGGTGCAGCAAGAAGAACGGATGAGGATGGA-3'

【図 9】



1 / 3

SEQUENCE LISTING

<110> Naomi Yamakawa

<120> A Method for measuring 5-methylcytosine

<130>

<160> 6

<210> 1

<211> 225

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<223> A part of GenBank/M95408

<400> 1

CGTGAAGCCT TTTCAAGGAG TGAAGAACAA TGATGTGATC GGTCGAATTG AAAATGGGGA
60

AAGATTACCA ATGCCTCCAA ATTGTCCTCC CACCCTCTAC AGCCTTATGA CGAAATGTTG 120
GGCCTATGAC CCCAGCAGGC GGCCCAGGTT TACTGAACTA AAAGCTCAGC TCAGCACAAT
180

CCTGGAGGAG GAGAAGGTGC AGCAAGAAGA ACGGATGAGG ATGGA 225

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 2

CGTGAAGCCT TTTCAAGGAG

20

2 / 3

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 3

TCCATCCTCA TCCGTTCTTC

20

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 4

CACATCATTG TTCTTCACTC CTTGAAAAGG

30

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 5

CAATTGGAG GCATTGGTAA TCTTTCCCCA

30

<210> 6

<211> 30

3 / 3

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of artificial sequence: Synthetic oligonucleotide

<400> 6

TTCGTCATAA GGCTGTAGAG GGTGGGAGGA

30

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2003年

日本国登録実用新案公報 1994-2003年

日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
JICST(JOIS), CA(STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/A	W. SCHNEDL et al, "5-Methylcytosine in Heterochromatic Regions of Chromosomes: Chimpanzee and Gorilla Compared to the Human" Chromosoma Vol. 52(1975) p. 59-66	1, 3/2
A	須永弥咲「免疫染色法によるDNA 5-メチルシトシンの検出」 Journal of Mammalian Ova Research Vol. 20 (2003年4月)p. 55-57	1-3

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26. 12. 03

国際調査報告の発送日

03.02.04

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 祥子



2J

9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3251

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

